

**NACHWEIS UND KLINISCHE BEDEUTUNG VON
ZENTROMERANTIKÖRPERN BEI PROGRESSIVER
SYSTEMISCHER SKLERODERMIE**

CHÉRINE YOUSRY

1986

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0110

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof.Dr.med.Dr.h.c.O.Braun-Falco

NACHWEIS UND KLINISCHE BEDEUTUNG
VON ZENTROMERANTIKÖRPERN BEI
PROGRESSIVER SYSTEMISCHER SKLERODERMIE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Chérine Yousry
aus Kairo
1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.Dr.h.c.O.Braun-Falco

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der
mündlichen Prüfung: 8. April 1986

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. Die progressive systemische Sklerodermie (PSS) Definition und Krankheitsbilder	1
2. Das CREST-Syndrom als Sonderform der PSS Definition und Krankheitsbild	3
3. Pathogenese und Ätiologie der PSS	4
4. Antinukleäre Antikörper (ANA) bei PSS Nachweis und Klassifizierung	4
5. Antizentromerantikörper (AcA) bei PSS Nachweis und klinische Bedeutung	5
II. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	6
III. MATERIAL UND METHODEN	7
1. Zellkultur	7
2. Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)	10
IV. ERGEBNISSE	13
1. Reaktivität von AcA mit Fibroblasten von gesunden und Sklerodermiepatienten	13
2. Reaktivität von anderen ANA mit HE-19- Fibroblasten	21

V. DISKUSSION	24
1. Die Antigenspezifität der Zentromerantikörper	24
2. Die klinische Bedeutung der Zentromerantikörper	32
VI. ZUSAMMENFASSUNG	40
VII. LITERATURVERZEICHNIS	42
VIII. DANKSAGUNG	54
IX. LEBENSLAUF	55

I. EINLEITUNG

1. Die progressive systemische Sklerodermie (PSS) Definition und Krankheitsbilder

Die Sklerodermie ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des gefäßführenden Bindegewebes unbekannter Ätiologie. Sowohl Manifestationsalter als auch Krankheitsdauer sind sehr unterschiedlich; Frauen werden 3,5 mal häufiger als Männer betroffen (2).

Die Erkrankung tritt in zwei Hauptformen mit verschiedenen Unterformen auf: entweder lokalisiert als zirkumskripte Sklerodermie oder aber als progressive systemische Sklerodermie. Zwischen beiden Formen bestehen nur sehr selten Übergänge.

Die PSS führt zu einer wechselnd ausgeprägten Sklerose der Haut mit möglicher Beteiligung der Muskulatur, Gelenke und auch innerer Organe: vor allem Lunge, Niere, Darm und Herz.

Nach Barnett (4) bzw. Fiessinger und Housset (26) unterteilt man entsprechend der Lokalisation und Ausdehnung:

Typ I: Akrosklerodermie mit Befall distal vom Handgelenk.

Typ II: Proximal ascendierende Sklerodermie mit
über die Handgelenke hinausgehender
Sklerose.

Typ III: Diffuse (maligne) Sklerodermie am Stamm
beginnend.

Nach einem Vorschlag der Arbeitsgemeinschaft
Sklerodermie der ADF (2) werden die genannten
Typen ferner in:

- a) nicht entzündliche
- b) entzündliche

Formen unterteilt.

Eine entzündliche Form wird angenommen, wenn mehr
als drei der folgenden immunologischen und entzünd-
lichen Parameter deutlich pathologisch verändert
sind:

- 1 - BSG
- 2 - Leukozyten
- 3 - ANA
- 4 - Gamma-Globulin
- 5 - Waaler-Rose-Test.

2. Das CREST-Syndrom als Sonderform der PSS

Als CREST wird eine Sonderform der PSS definiert, bei welcher folgende fünf Befunde zu finden sind:

- 1 - Calcinosis cutis
- 2 - Raynaud-Phänomen
- 3 - Oesophageale Dysfunktion
- 4 - Sklerodaktylie
- 5 - Teleangiektasien.

Die Abgrenzung des CREST-Syndroms geht auf die Beschreibung eines Patienten mit diffuser Sklerodermie, generalisierten Teleangiektasien, ausgedehnter Calcinose und Raynaud-Syndrom durch Thibierge und Weissenbach im Jahre 1911 zurück (61). 1964 wurden weitere Patienten mit dem "Thibierge-Weissenbach-Syndrom", die allerdings eine Akrosklerodermie zeigten, von Winterbauer als CRST-Syndrom herausgestellt (68). Velayos und Mitarbeiter (65), konnten bei fast allen diesen Patienten eine Ösophagusbeteiligung nachweisen, so daß sich der endgültige Begriff CREST-Syndrom herausbildete. Rodnan und Mitarbeiter (49) fanden bei 38 Patienten mit CREST-Syndrom eine geringer ausgeprägte Haut- und Organbeteiligung als bei den übrigen Sklerodermie-Patienten; eine Myokard- oder Nierenbeteiligung war nur selten nachweisbar, bei zwei Patienten bestand dagegen eine biliäre Zirrhose. Allerdings entwickelte sich bei 10 der 38 CREST-Patienten (26 %) als Spätkomplikation

eine pulmonale Hypertonie mit Cor pulmonale; autoptisch zeigten diese Fälle eine ausgeprägte Intimahyperplasie der kleinen Lungenarterien, dagegen fast keine fibrotischen Lungenveränderungen (52). Das CREST-Syndrom kann daher nur bedingt als eine gutartige Verlaufsform der PSS angesehen werden (55).

3. Pathogenese und Ätiologie der PSS

Diskutiert werden sowohl Regulationsstörungen im Kollagenstoffwechsel mit gesteigerter Kollagensynthese der Fibroblasten als auch entzündliche Veränderungen im Kapillarbereich mit reaktiver Intimaproliferation und perivaskulärer Fibrose als auch zellvermittelte oder humorale Autoimmunvorgänge (36). Letztere sind bei fast allen PSS-Patienten nachweisbar. Zu ihnen gehören sowohl unspezifische Befunde wie Rheumafaktoren, Hypergammaglobulin als auch spezifische Faktoren, vor allem antinukleäre Antikörper (ANA),

4. Antinukleäre Antikörper bei PSS

Antinukleäre Antikörper wurden 1958 zum erstenmal bei PSS von Bardawil et al. (3) auf Rattenleberkryostatschnitten mit indirekter Immunfluoreszenz (34) nachgewiesen. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz konnten antinukleäre Antikörper von

nukleolärem, homogenem und geflecktem Bindungsmuster unterschieden werden (6, 40, 51, 58). Nach Meurer et al. finden sich antinukleäre Antikörper mit geflecktem Bindungsmuster bei 63,5 % der PSS-Patienten; homogene antinukleäre Antikörper bei 11,5 % und nukleoläre Antikörper ebenfalls bei 11,5 % der untersuchten Patienten (41). Antinukleäre Antikörper mit nukleolärem Bindungsmuster haben diagnostische Bedeutung für die PSS und sind nur selten bei anderen Bindegewebserkrankungen (SLE, PCP) zu finden (9, 46, 60).

In den letzten Jahren werden als Antigensubstrat zunehmend sogenannte HEP-2-Zellen verwendet. Diese teilungsaktiven, aus menschlichem Larynxkarzinom gezüchteten Zellen sind in der Metaphase arretiert und reagieren empfindlicher als reife tierische Organgewebe mit ANA. Dabei zeigen sie ein charakteristisches Immunfluoreszenzmuster, das von der Teilungsphase der Zellkerne abhängt: in Zellkernen der Interphase sieht man gleichmäßig verteilte fluoreszierende Punkte, deren Zahl dem diploiden Chromosomensatz entspricht. In Zellkernen der Metaphase dagegen verdichten sich diese Punkte zu einem paarigen Muster, das durch die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialplatte bedingt ist (siehe auch Abbildung 3).

5. Die Antizentromerantikörper (ACA)

Antizentromerantikörper sind Antikörper, die gegen ein Kernproteinantigen gerichtet sind, welches in

der Zentromerregion der Chromosomen lokalisiert ist. Von Moroi et al. (42) wurden sie erstmals mittels der indirekten Immunfluoreszenz auf HEp-2-Zellen entdeckt. An Rattennierenkryostatschnitten kann das Antizentromermuster leicht übersehen werden, und als feingesprenkelt ("fine speckled") fehlinterpretiert werden (2).

II. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Zentromerantikörper auch mit menschlichen Fibroblasten, die von gesunden und Sklerodermie-Patienten stammen, reagieren.

Im zweiten Teil werden Vorkommen, diagnostische und prognostische Bedeutung von Zentromerantikörpern anhand der eigenen Fälle und den Angaben aus der Literatur dargestellt.

III. MATERIAL UND METHODE

1. Zellkultur

a) Zellsubstrate:

- Embryonale Fibroblasten von Normalpersonen:
HE-28-Fibroblasten aus der 14. Passage,
HE-19-Fibroblasten aus der 9. Passage
- Kontrollfibroblasten einer 33-jährigen
Normalperson: Ko-33 aus der 8. Passage
- Fibroblasten von Sklerodermie-Patienten:
N.M. und Na.H. aus der 8. Passage
- Epidermale Zellen von der Maus:
HEL-30 aus der 3. Passage (Lit.-Ref. 16).

b) Reagenzien:

- Dulbecco Leermedium steril filtriert mit
folgenden Zusätzen:

Fötales Kälberserum (FKS)	10 %	(10 ml/100 ml Leermedium)
Penicillin + Streptomycin	1 %	
Glutamin	1 %	
Vitamin C (Ascorbat)	5 mg%	

- Gepufferte Phosphatlösung:

PBS-Puffer nach Merck: 0,01 M PO_4 ; pH 7,1.

Der PBS-Puffer wurde hergestellt aus:

8,5 g NaCl Kristall zur Analyse	Merck 6464
1,07 g Na_2HPO_4 ohne H_2O	Merck 6586
0,39 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	Merck 6345

zusätzlich ad 1000 ml aqua dest.

Der pH wurde kontrolliert mit dem Digital-pH-Meter der Firma Beckmann.

- EDTA: Stammkonzentration 1 %; pH 7,2
Arbeitsverdünnung 0,02 % in PBS
- Trypsin: Stammkonzentration 2,5 % in PBS
Arbeitsverdünnung 0,1 % in PBS
beide Reagenzien wurden steril filtriert.
- Äthylalkohol: Arbeitsverdünnung 70 %
- Deckgläser für Hämatocytozometer 24 x 32 mm
(Fa. Menzel)
- Sterile Petrischalen
- Brutschrank
- Mikroskop.

b) Durchführung:

Vorbereitung der Zellen und Anlegen einer
Zellkultur
(Kultivierung)

Die in flüssigem Stickstoff (-192°C) tiefgefroren aufbewahrten Zellen werden bei Zimmertemperatur aufgetaut und in sterilen Petrischalen mit Medium und dann mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für ca. 1 Minute mit 3 ml Trypsin inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wird das Trypsin bei Abrundungsbeginn der Zellen dekantiert und mit dem Trypsinrest werden diese Zellen für weitere 3 bis 5 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Anschließend werden 14 ml Medium hinzugegeben und die Zellen auf zwei Schalen mit einem Endvolumen von 6 ml aufgeteilt.

Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt; dabei werden die Zellen ein- oder zweimal mit PBS gewaschen.

Ca. alle 3 bis 4 Tage, wenn der Zellrasen zu dicht wächst, werden die Zellen passagiert und auf neue Petrischalen aufgeteilt, welche sterile Deckgläser enthalten, die von den Zellen überwachsen werden. Wenn Zellsubstrate benötigt werden, werden die einschichtig mit den Zellen bewachsenen Deckgläser in PBS gelegt, gewaschen und dann 5 Min. in 70 % Äthylalkohol fixiert. Somit sind die Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet. Der gesamte Ablauf wird unter sterilen Bedingungen vollzogen.

2. Indirekte Immunfluoreszenz-Untersuchung

a) Material

Untersucht wurden die Seren von 20 Patienten; von diesen hatten sieben eine PSS, 12 wiesen verschiedene LE-Formen auf, und eine hatte ein MCTD (mixed connective tissue disease).

Die Seren stammen von:

- 1 Patienten mit chronisch diskoidem Lupus erythematoses (DLE)
- 4 Patienten mit subakutem kutanen Lupus erythematoses (SCLE)
- 7 Patienten mit systemischem Lupus erythematoses (SLE)
- 6 Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie vom Typ II (PSS-II)
- 1 Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie vom Typ I (PSS-I)
- 1 Patienten mit mixed connective tissue disease (MCTD).

Als Kontrolle dienten das Serum einer Normalperson (P.) und eine serumfreie FITC-Kontrolle (= technische Kontrolle).

- Die Antikörper wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf HEp-2-Zellen nachgewiesen (Kallestad Diagnostica, D - 7800 Freiburg, Colombistr. 27, FRG).
- Die Serumverdünnung war 1:20.
Die Antikörperbindung wurde mit Hilfe eines FITC-markierten Anti-human-IgG-Serums nachgewiesen (Ziege, F/P-Ratio: 3,0; Verdünnung 1:120).
- Reagenzien:
 - FITC-konjugiertes Anti-human-Immunglobulin-G (Ziege);
Fluoreszein-Protein-Verhältnis (F/P) 3,0;
Atlantic Antibodies, Nonsuch Road, Scarborough, M.E., USA.
 - Glyzerin-Puffer
Arbeitsverdünnung 100 % oder 9:1 mit PBS
 - Objektträger 76 x 26 mm
 - Filterpapier
 - Feuchte Kammer
 - HEp-2-Zellen (Kallestad Diagnostica, D 7800, Freiburg)
 - Filmmaterial:
für Schwarz-Weiß-Aufnahmen:
Ilford HP 5, 135/36 (27 DIN/ASA 400)
Kodak Panatomic X, FX 135/36, (16 DIN/ASA 32)

- Fluoreszenzmikroskop: (Orthoplan, Firma Leitz, Wetzlar); mit Auflichtilluminator nach Ploem.

Filterkombination: Sperrfilter: 2 x KP 490

(= KP 500),

1 x K 510,

Filter im Lampenhaus 4 mm BG 38

- Eindeckmedium: Polyvinylalkohol-Glycerin-Gemisch.

Die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von ANA auf HEp-2-Zellen erfolgte nach Angabe des Herstellers (Kallestad Diagnostika).

Die indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Bindung von ANA an die Zellkerne der verschiedenen Zellsubstrate wurde in folgender Weise durchgeführt:

24 x 32 mm große Deckgläser mit den fixierten Zellen auf der Oberseite wurden auf Objektträger gekittet, dann mit dem zu untersuchenden Serum (Arbeitsverdünnung 1:20) eine halbe Stunde lang inkubiert. Das Serum wurde dann abdekantiert und die Objektträger 3 x 10 Min. in PBS (pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer feuchten Kammer mit FITC-markiertem Antiserum, in der Arbeitsverdünnung von 1:120, eine halbe Stunde inkubiert, dann erneut 3 x 10 Min. in PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Deckglaspräparate mit Polyvinylalkohol-Glycerin eingedeckt, mikroskopisch ausgewertet und photographisch dokumentiert.

IV. ERGEBNISSE

1. Reaktivität von Zentromerantikörpern mit Fibroblasten von Normalpersonen und Sklerodermiepatienten

Das Serum einer Patientin (K.A.) mit Zentromerantikörpern (AcA) wurde mit vier verschiedenen Zellsubstraten untersucht:

1. Fibroblasten einer Patientin (N.M.) mit PSS vom Typ-I, die ebenfalls AcA aufweist,
2. humane embryonale Fibroblasten (HE),
3. HEL-30-Zellen von Mäuseepidermis und
4. humane Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson.

Als Kontrollen diente das Serum einer gesunden Person (P.).

Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:20 in PBS angesetzt.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Inkubation der vier Zellsubstrate mit dem Serum der Patientin und der Kontrolle.

Tabelle 1:

Seren	Zellsubstrat normale Kontroll- fibroblast.	Sklerodermie- fibroblasten (N.M.)	HE- Fibro- blasten	epidermale HEL-Zellen
K.A. (Sklerodermie- Patientin)	AcA +++	AcA +++	AcA +++	AcA +++
P. (Normalperson = Kontrolle)	∅	∅	∅	∅
FITC (serumfreie Kontrolle)	∅	∅	∅	∅

+ = Reaktion mit der Zentromer-Region

∅ = kein spezifisches Antikörper-Antigen-Bindungsmuster
in der indirekten Immunfluoreszenz; also höchstens
unspezifische Fluoreszenz

AcA = Antizentromerantikörper-Bindungsmuster in der indi-
rekten Immunfluoreszenz.

Zu Tabelle 1:

Wie aus Tabelle 1 zu entnehmen ist, wurden in der indirekten Immunfluoreszenz nach der Inkubation mit dem Patientenserum auf sämtlichen Substraten ein charakteristisches Zentromerbindungsmuster beobachtet. Dabei fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Substraten in Bezug auf die Deutlichkeit und Intensität des ACA-Bindungs-Bindungsmusters.

Im Gegensatz dazu war nach der Inkubation mit dem Kontrollserum oder mit der serumfreien FITC-Kontrolle keinerlei spezifisches Bindungsmuster zu erkennen.

Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen, daß das Bindungsmuster dieser Antikörper auf Sklerodermiefibroblasten (N.M.) und auf HE-Fibroblasten ähnlich dem auf HEp-2-Zellen ist. In allen Fällen zeigen die Zellen eine charakteristische feingesprenkelte Fluoreszenz, die gleichmäßig über die Zellkerne verteilt ist.

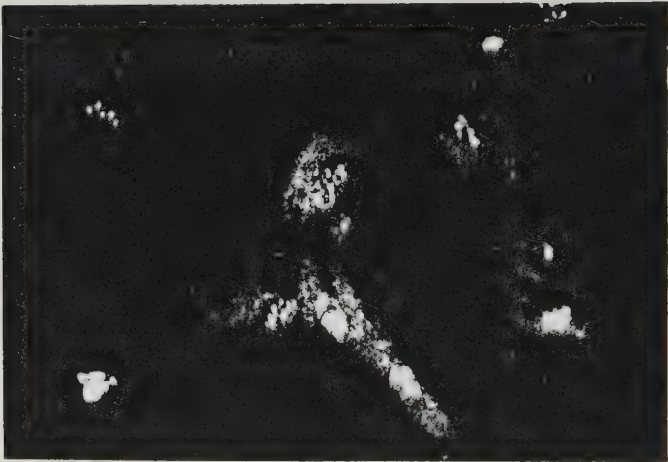


Abbildung 1: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)
auf Sklerodermiefibroblasten (60 x)
Zentromer-Bindungsmuster



Abbildung 2: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)
auf HE-19-Fibroblasten (100 x)
Zentromer-Bindungsmuster

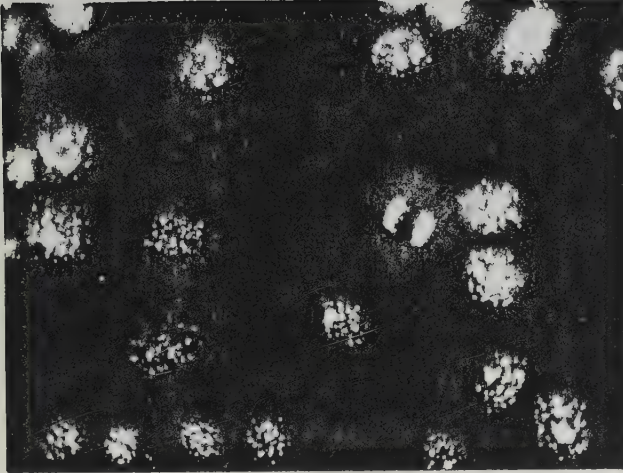


Abbildung 3: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)
auf HEp-2-Zellen (100 x)
Zentromer-Bindungsmuster



Abbildung 4: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)
HE-19-Fibroblasten (60 x)
homogenes Bindungsmuster



Abbildung 5: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)
auf HE-19-Fibroblasten (60 x)
fein-gesprenkeltes Bindungsmuster



Abbildung 6: Indirekte Immunfluoreszenz (IIF)
auf HEp-2-Zellen (100 x)
membranöses Bindungsmuster

Legende zu den Abbildungen 1 - 6:

Indirekter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von
antinukleären Antikörpern.

Serumverdünnung 1:20,

FITC-anti-human-IgG (F/P-Verhältnis 3,0;

Verdünnung 1:120)

Abb. 1: Zentromer-Bindungsmuster auf Fibroblasten
der Patientin N.M. mit PSS Typ-I als
Antigensubstrat bei 60 x Vergrößerung.
Das Serum stammt von der Patientin K.A.
mit PSS-Ib.

Abb. 2: Zentromer-Bindungsmuster bei PSS-Ib auf
human-embryonale Fibroblasten (HE-19) als
Antigensubstrat bei 100 x Vergrößerung.
Das Serum stammt von der Patientin K.A.
mit PSS-Ib.

Abb. 3: Zentromer-Bindungsmuster auf HEP-2-Zellen
als Antigensubstrat bei 100 x Vergrößerung.
Das Serum stammt von der Patientin K.A.
mit PSS-Ib.

Abb. 4: Homogenes Bindungsmuster auf human-embryo-
nale Fibroblasten (HE-19) als Antigen-
substrat bei 60 x Vergrößerung.
Das Serum stammt von der Patientin G. mit
SLE/Raynaud.

Abb. 5: Feingesprenkeltes Bindungsmuster auf human-embryonale Fibroblasten (HE-19) als Antigen substrat bei 60 x Vergrößerung. Das Serum stammt von der Patientin G.V. mit SCLÉ.

Abb. 6: Membranöses Bindungsmuster auf HEp-2-Zellen als Antigen substrat bei 100 x Vergrößerung. Das Serum stammt von der Patientin G.V. mit SCLÉ.

2. Reaktivität anderer ANA-Seren mit HE-19-Zellen

Der erste Versuch hatte gezeigt, daß HE-19-Fibroblasten sich gut als Antigensubstrat zum Nachweis von ANA eignen. Dieses wurde überprüft mit Patientenseren, welche zuvor auf Rattenleberkryostatschnitten unterschiedliche ANA-Bindungsmuster gezeigt hatten.

Die Seren wurden alle mit Fibroblasten der HE-19-Zellkultur aus der 9. Passage inkubiert und anschließend mittels indirekter Immunfluoreszenz ausgewertet; das Ergebnis wurde dokumentiert mit Schwarz-Weiß-Filmmaterial von Ilford bei den Vergrößerungen 40-fach, 60-fach und auch teilweise 100-fach.

Tabelle 2 zeigt die Kernbindungsmuster der Patientenseren im indirekten Immunfluoreszenztest auf HE-19-Fibroblasten sowie auf Rattenleberkryostatschnitten und HEp-2-Zellen als Vergleich.

Tabelle 2: Vergleich von ANA-Bindungsmuster im IIF-Test auf Rattenleber, HEP-2-Zellen und HE-19-Fibroblasten

Seren	Diagnosen	ANA-Bindungsmuster auf		
		Rattenleber	HEP-2-Zellen	HE-Fibroblasten
Meyers	SCLE/Sjögren-Syndrom	n.d.	-	-
Morcombe	SLE	n.d.	speckled	grob speckled
Feelme	SLE	n.d.	speckled	fein speckled
Sc1-70	PSS-II	n.d.	fein speckled	speckled
T.D.	SCLE	speckled	speckled	fein speckled
K.K.	SLE	speckled	speckled	fein speckled
V.R.	PSS-IIa Polymyositis	nukleolär	nukleolär	nukleolär
G.V.	SCLE	membranös	membranös	fein speckled
G.	SLE/Raynaud	membranös	membranös	homogen/speckled
Z.F.	SLE	grob speckled	n.d.	homogen/speckled
B.L.	MCTD	speckled	grob speckled++	(grob+) fein speckled
M.C.	SLE	homogen	homogen	membranös
M.J.	PSS-IIa / CREST prim.bil.Zirrhose	speckled	(homogen randbetont)-membranös	fein speckled
P.E.	PSS-IIa	speckled	nukleolär	true speckled
W.E.	PSS-IIb	fein speckled	fein speckled	fein speckled
K.A.	PSS-Ib	∅	zentromer+++	zentromer
H.L.	PSS-IIb/Sicca-Syn.	nukleolär	nukleolär	-
S.U.	SLE	-	-	fein speckled
R.C.	SCLE/Sjögren-Syndrom	-	-	fein speckled
S.H.	DLE	speckled	speckled	fein speckled/ homogen

n.d. = nicht durchgeführt

Zu Tabelle 2:

Wie Tabelle 2 zeigt, stimmen die Bindungsmuster auf HE-19-Fibroblasten in den meisten Fällen mit den auf HEp-2-Zellen und Rattenleberkryostat-schnitten bestimmten Immunfluoreszenzbindungs-muster überein. Besonders deutlich lassen sich auf HE-19-Fibroblasten ANA mit homogenem Bindungs-muster darstellen (Abb. 4), die vor allem bei Patienten mit SLE vorkommen. Allerdings zeigten sich in vier von 20 Fällen andere Ergebnisse. So zeigte das Serum der Patientin G.V. (mit SCLE) ein feingesprenkeltes Muster (Abb. 5), während die Ergebnisse auf HEp-2-Zellen ein membranöses Bin-dungsmuster erkennen ließen (Abb. 6). Das Serum der Patientin H.L. (mit PSS-IIb und Sicca-Syndrom) ergab auf HE-19-Fibroblasten ebenfalls ein fein-gesprenkeltes und nicht ein nukleoläres Bindungs-muster wie auf HEp-2-Zellen. Erwähnenswert ist, daß das Zentromerbindungsmuster, welches sich auf HEp-2-Zellen (Abb. 3), aber nicht auf Rattenleber-kryostatschnitten darstellen ließ, auch auf den HE-19-Fibroblasten deutlich zu erkennen war (Abb. 2) (Serum von K.A. mit PSS-Ib).

Im allgemeinen ist aber festzuhalten, daß die ANA-Immunfluoreszenzmuster auf HE-Fibroblasten als Antigensubstrat nicht so deutlich erkennbar und zu unterscheiden sind wie auf Rattenleber-kryostatschnitten und vor allem auf HEp-2-Zellen.

V. DISKUSSION

1. Die Antigenspezifität der Zentromerantikörper

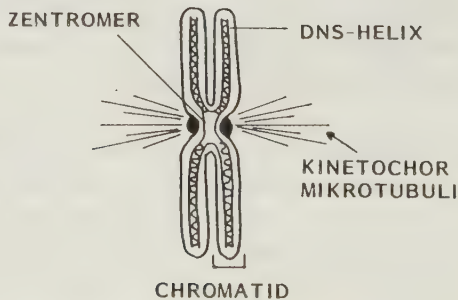
Die Zentromerantikörper sind gegen ein Kernprotein gerichtet, welches in der Zentromerregion der Chromosomen lokalisiert ist.

Das Antigen ist wahrscheinlich ein Protein, welches an DNS gekoppelt ist (42).

Die Reaktivität des Zentromer-Antigens wird durch Methanolessigsäure zerstört (42), ist aber unempfindlich gegenüber DNase, RNase, Proteinase und nicht-ionische Detergenzien (28).

Die Zentromerregion

Abbildung 7:



SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES
METAPHASEN-CHROMOSOMS

Die Zentromerregion ist in den meisten tierischen Zellen als lokalisierte Einschnürung der sonst linearen Metaphasenchromosomen zu erkennen; hier beginnt die Chromatidenteilung bei Beginn der Anaphase (Abb. 7). Diese Region ist auch der Ort, wo die Mikrotubuli der Spindel ansetzen. Die Zentromerregion kann von einem Chromosom zum anderen eine unterschiedliche Lage aufweisen; sie befindet sich aber bei homologen Chromosomen immer an gleicher Stelle und das Lagemuster der Zentromerregion ist bei einer bestimmten Spezies konstant (17).

Im Elektronenmikroskop ist bei einigen Arten innerhalb der Zentromerregion eine spezialisierte Struktur, das Kinetochor zu erkennen. Seine Ultrastruktur ist in verschiedenen Pflanzen und Tierarten unterschiedlich und wurde für Säugetierzellen folgendermaßen beschrieben (17):

Das Kinetochor weist im Durchmesser eine trilaminare Schichtung auf, mit einer elektronendichten Außenplatte, einer schwach anfärbbaren mittleren Schicht und einer inneren Region, die unmittelbar dem darunter liegenden Zentromerchromatin anliegt. Mit der Außenplatte sind die Spindelmikrotubuli verbunden.

Die chemische Struktur der Kinetochoren ist weitgehend unbekannt, obwohl zytochemische Analysen Hinweise sowohl auf DNS- als auch auf RNS-Gehalt geben; die DNS spielt eine Rolle bei der Erhaltung

der Kinetochorstruktur. In Kinetochoren von mitotischen Säugetierzellen wurde auch Tubulin gefunden, das eine wichtige Rolle bei der Organisation von Mikrotubuli spielt.

Zum Ende der Mitose werden sowohl die Zentromerregion, als auch die Kinetochorstruktur nach den heutigen Methoden nicht darstellbar und bleiben somit während der Interphase verborgen. Durch Depolarisierung der Mikrotubuli mittels Colcemid kann die Zellteilung während der Mitose arretiert werden.

Zentromerantikörper sind spezifisch gegen die trilineare Struktur des Kinetochors in den Meta- und Anaphasenchromosomen gerichtet.

Dabei reagiert offenbar nur die innere und äußere Kinetochorplatte und das unmittelbar anliegende Chromatin. Demzufolge bezieht sich die Antigenität nur auf die Kinetochorplatten und nicht auf das darunterliegende Zentromerchromatin; wahrscheinlich ist das Antigen ein Protein oder ein Polypeptid mit starker Assoziation zur Zentromer-DNS.

Das antikörperspezifische Antigen selbst ist noch nicht identifiziert worden. Durch Vorbehandlung von Patientenseren mit Mikrotubulusprotein, gereinigtem Tubulin, Actin und Mikrotubulus-assoziiertem Protein konnten die Zentromerantikörper bisher nicht absorbiert werden (17).

Nachweis von Zentromerantikörper (AcA)

AcA wurden zuerst von Moroi (42) 1980 entdeckt. Er verwendete als Antigensubstrat Chromosomenausstriche von Ramos-human-B-Lymphoidzellen, und Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, außerdem HEp-2-Zellen und Mäusenierenkryostatschnitte.

In den folgenden Jahren wurden, wie Tabelle 3 zeigt, auch andere Zellsubstrate zum Nachweis von AcA eingesetzt.

Tabelle 3:

Autoren	Lit.- Ref.	Zellsubstrate
Moroi (1980)	42	Chromosomen von :1) Ramos human-B-Lymphoidzellen (ohne Epstein-Barr-Virus-Genom) 2) Ehrlich-Aszites-Tumorzellen von Mäusen 3) CHO (chinese hamster ovary). HEp-2-Zellen und Mäuseniere.
Tan (1980)	58	HEp-2-Zellen, Mäuseniere und Chromosomen der Adeno-Zelllinie Colo 320
Fritzler (1980)		HEp-2-Zellen, HEp-2-Chromosomen, HeLa, Ehrlich, Muntjac, BHK (baby hamster kidney), Mäuseleber, -niere, -testis, -thymus und -darm.
Fritzler (1984)	30	HEp-2-Zellen, Mäuseniere, Crithidia luciliae
Werner (1981)	66	Ehrlich-Aszites-Zellen PtK-1 = rat kangaroo
Brentnall (1980)	18	Embryonale Rattenfibroblasten.
Kallenberg (1981)	35	Fötale Humanfibroblasten (Mono- layers), HEp-2-Chromosomen,
Brenner (1981)	17	PtK-2, Indian Muntjac, Swiss Mouse 3T3, CHO-K-1, Mouse L-929, NRK (normal rat kidney), Humane Vorhautfibroblasten
Tan (1980)	59	BHK- und HEp-2-Zellen. Mäuseniere

Tabelle 3: - Blatt 2 -

Autoren	Lit.- Ref.	Zellsubstrate
Bernstein (1982)	9	HEp-2-Zellen
Maddison (1983)	37	HEp-2-Zellen
Tirri (1982)	62	HEp-2-Zellen, Mäusefibroblasten
McCarty (1983)	39	HEp-2-Zellen, humane Knochenmarkzellen
Tuffanelli (1983)	64	PTK ₁ -Zellen
Catoggio (1983)	19	HEp-2-Zellen
Makinen (1983)	38	HEp-2-Zellen, Mäuseniere, HEp-2-Chromosomen.
Steen (1984)	54	HEp-2-Zellen, Rattenleber
Tramposch (1984)	63	HEp-2-Zellen
Powell (1984)	47	HEp-2-Zellen; Affenösophagus, Chinese Hamster, humane Fibroblasten, humane epidermale Karziomzellen; human osteogenic sarcoma
Guldner (1984)	32	HEp-2-Zellen; HeLa-Zellen, HeLa-Chromosomen

Tabelle 3: - Blatt 3 -

Autoren	Lit.- Ref.	Zellsubstrate
Beutner (1985)	12	Mäuseniere, -leber, Affenösophagus HEp-2-Zellen; Mäusefibroblasten, humane KB-Zellen (orales Epidermoid-Karzinom)
Chen (1985)	20	HEp-2-Zellen
Chorzelski (1985)	21	HEp-2-Zellen; Affenösophagus
Moroi (1983)	43	humane B-Lymphoidzelllinie, Wil2-, CHO-, HeLa-Zellen
Cox (1983)	23	PtK ₁ ; L; 3T3; BHK; HeLa-S ₃ - Chromosomen; Neuroblastom; Indian-Muntjac.
Earnshaw (1984)	24	HeLa-S ₃ -Zellen; HeLa-S ₃ -Chromosomen
French (1985)	27	HEp-2-Zellen
Meurer (1985)	41	HEp-2-Zellen

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen ist, wurden von den meisten Autoren als Antigensubstrat für den Nachweis von Zentromerantikörpern HEP-2-Zellen verwendet. Diese antinukleären Antikörper reagierten aber auch mit menschlichen oder Mäusefibroblasten (12, 17, 18, 35, 47, 62).

Seltenere Antigensubstrate zum Nachweis von Zentromer-Antikörpern sind CHO (chinese hamster ovary (42, 64)), BHK (baby hamster kidney (23, 28)), und PtK₁ (rat kangaroo (23, 64, 66)).

Zentromerantikörper können sowohl mit intakten Zellkernen reagieren als auch mit Chromosomenpräparationen, von z.B. *Drosophila melanogaster*, Ramos, Human-B-Lymphoidzellen (42), Ehrlich-Aszites-Tumorzellen (42), CHO- (42), HEP-2- (28, 35, 38) und HeLa-Zellen (23, 24, 32). Neuerdings wurden auch zufriedenstellende Ergebnisse bei der Verwendung von Affenösophaguskryostatschnitten als Antigensubstrat bekannt, so z.B. bei Powell und Chorzelski (21, 47).

Die Reaktivität von Zentromerantikörpern mit Fibroblasten

Wie Tabelle 1 zeigt, konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, daß Zentromerantikörper sowohl

mit Fibroblasten von Normalpersonen als auch mit normalen embryonalen Fibroblasten (HE-19) vom Menschen sowie mit epidermalen Zellen von der Maus (HEL) reagieren.

Besonders erwähnenswert ist, daß die Fibroblasten von einer Patientin (N.M.), die selbst Zentromerantikörper aufweist, ebenso wie Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (P.) eine Reaktion mit dem Zentromerantikörper-Serum von K.A. zeigten. Diese Beobachtung weist darauf hin, daß die Fibroblasten von Sklerodermiepatienten ihre Antigenstrukturen für spezifische Autoantikörper nicht verlieren.

2. Assoziation von Zentromerantikörpern mit klinischen Krankheitsbildern (Literaturübersicht)

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse aller verfügbaren Arbeiten über die Assoziation von Zentromerantikörpern mit klinischen Krankheitsbildern aufgeführt.

Tabelle 4:

Autor	Lit.- Ref.	(n)	klinische Diagnose	Anzahl AcA-pos. Patienten
Tuffanelli et al.	64	200	PSS, davon	45 (22,5 %)
		43	CREST	35 (81,4 %)
		35	diffuse Sklerodermie	3 (8,6 %)
		25	entzündliche Form	1 (4,0 %)
		43	prodromale Sklerodermie	6 (14,0 %)
		54	lokalisierte Sklerodermie	0 (-)
Tan et al.	58	50	PSS davon	
		24	CREST (3 x n.d.)	12 (57,0 %)
		26	diffuse Sklerodermie (2 x n.d.)	2 (8,0 %)
Moroi et al.	42	8	CREST	7 (87,5 %)
		24	diffuse Sklerodermie	3 (12,5 %)
Fritzler et al.	28	27	CREST	26 (96,0 %)
		26	systemic sclerosis (PSS)	3 (12,0 %)
		3	linear scleroderma (Morphea)	0 (-)
		14	Raynaud	4 (29,0 %)
		15	MCTD	1 (7,0 %)
		60	SLE	1 (2,0 %)
Kallenberg et al.	35	40	scleroderma	7 (17,5 %)
		10	CREST	7 (70,0 %)
		24	sek. Raynaud	7 (29,2 %)
		1	Sjögren	1
Bernstein et al.	9	76	PSS, davon	
		49	diffuse Sklerodermie	2 (4,1 %)
		27	CREST	19 (70,4 %)

Tabelle 4: - Blatt 2 -

Autor	Lit.- Ref.	(n)	klinische Diagnose	Anzahl AcA-pos. Patienten
Tirri et al.	62	3	akute diffuse Sklerodermie	1 (33,0 %)
		16	Sklerodaktylie	8 (50,0 %)
		12	Sklerosis sine Sleroderma	3 (25,0 %)
		48	Akrosklerosis stricto sensu	6 (12,5 %)
Tuffanelli et al.	64	45	PSS, davon	
		21	CREST	18 (86,0 %)
		5	entzündliche Sklerodermie	0
		19	diffuse Sklerodermie	1 (5,3 %)
		13	prodromale Sklerodermie	6 (46,0 %)
		22	lokalisierte Sklerodermie	0
			außerdem:	
		1	primäre biliäre Zirrhose	1
		1	LE-Pannikulitis	1
1	ohne Diagnose	1		
Catoggio et al.	19	16	diffuse Sklerodermie (PSS)	2 (12,0 %)
		18	CREST (4 - 5 Kriterien)	8 (44,0 %)
		6	CREST (3 Kriterien)	1 (17,0 %)
			non-PSS:	
		50	SLE	1 (2,0 %)
	15	prim. Raynaud	1 (7,0 %)	
Makinen et al.	38	48	primäre biliäre Zirrhose	14* (29,0 %)
		30	chronisch-aktive Hepatitis B	1 (3,3 %)
*davon 9 mit CREST-Kriterien				
Steen et al.	54	120	diffuse Sklerodermie	4 (3,0 %)
		141	CREST	69 (49,0 %)
Tramposch et al.	63	28	PSS: diffuse Sklerodermie	7 (25,0 %)
		7	CREST	6 (86,0 %)
		1	Raynaud	1
		1	PCP + Sjögren-Syndrom	1

Tabelle 4: - Blatt 3 -

Autor	Lit.- Ref.	(n)	klinische Diagnose	Anzahl AcA-pos. Patienten
Powell et al.	47	19	CREST	13 (68,0 %)
		27	Akrosklerosis	19 (70,0 %)
		36	diffuse Sklerodermie	2 (6,0 %)
		19	Morphea	1 (5,0 %)
		246	primäre biliäre Zirrhose	26* (11,0 %)
			*davon 16 mit CREST	
Beutner et al.	12	25	PSS (diffuse Sklerodermie)	3 (10,0 %)
		21	CREST	16 (75,0 %)
		3	Raynaud	3 (100 %)
Chen et al.	20	31	diffuse Sklerodermie	3 (10,0 %)
		32	CREST	16 (75,0 %)
		3	Raynaud	3 (100 %)
Chorzelski et al.	21	84	CREST (Akrosklerosis) a)	21 (25,0 %)
		54	Raynaud	4 (7,4 %)
		20	diffuse Sklerodermie b)	0 (-)
		10	intermitt. zw. a) u. b)	0 (-)
		46	andere Bindegewebskrankheiten	0 (-)
Meurer et al.	41	26	PSS-I Akrosklerodermie	10 (38,5 %)
		74	PSS-II diffuse Sklerodermie	8 (11,0 %)
		4	PSS-III	0 (-)
		20	CREST	14 (70,0 %)

Insgesamt wurden in der Literatur nach den vorliegenden Angaben (Tabelle 4) die Seren von 2.007 Patienten auf AcA untersucht. In 462 der Seren konnten diese Antikörper nachgewiesen werden. 310 dieser AcA-positiven Seren (67,3 %) stammten von Patienten, bei denen als klinische Diagnose CREST angegeben worden war. Besonders erwähnenswert ist, daß 25 Patienten mit AcA neben dem CREST-Syndrom eine primäre biliäre Zirrhose aufwiesen (38, 47).

Bei 35 weiteren Patienten mit Zentromerantikörper wurde eine Akrosklerodermie (PSS Typ I) diagnostiziert (41, 47, 62). Dazu ist allerdings anzumerken, daß vor allem im englischen Sprachraum die Begriffe CREST und Akrosklerodermie synonym verwendet werden, wobei in diesen Fällen häufig ein sogenanntes inkomplettes CREST-Syndrom vorliegt. Bei 58 Patienten mit AcA bestand eine PSS vom Typ II.

Bei 29 Patienten mit ACA bestand nur ein Raynaud-Syndrom (19, 20, 21, 28, 35, 63, 64) noch ohne Zeichen einer Hautsklerose. Es ist möglich, daß diese AcA-positiven Patienten mit Raynaud-Syndrom im späteren Verlauf eine PSS entwickeln. Daher gilt das Auftreten von Zentromerantikörpern bei Patienten mit Akrozyanose oder Raynaud-Syndrom als prognostisch wichtiger Hinweis auf die mögliche Entwicklung einer PSS (28, 35, 60).

Fritzler et al. (28) fanden, daß eine Raynaud-Symptomatik im Durchschnitt sieben Jahre lang vor dem CREST-Vollbild besteht.

Sehr selten (ca. 1 - 5 %) wurden AcA bei Patienten mit lokalisierten Sklerodermieformen gefunden (47). Andere Diagnosen finden sich bei Patienten mit AcA äußerst selten: zweimal wurden AcA bei SLE beschrieben (19, 28), ebenfalls zweimal bei Sjögren-Syndrom (35, 63) und einmal bei mixed connective tissue disease (28).

Zusammenfassend zeigt Tabelle 4, daß AcA bevorzugt beim CREST-Syndrom auftreten, wobei die Häufigkeit in der Literatur zwischen 25 % (21) und 96 % (28) angegeben ist. Rechnet man zu diesen Patienten diejenigen mit Akrosklerodermie hinzu, so beträgt die Häufigkeit von AcA bei Patienten mit CREST oder PSS-Typ-I im Mittel 58 %.

Dagegen liegt die Häufigkeit der AcA bei PSS vom Typ-II nur bei 9,7 %.

Bei Patienten mit primärer biliärer Zirrhose wird die Häufigkeit der AcA mit 11 - 29 % angegeben (38, 47). Nur weniger als 1 - 3 % der Patienten mit Morphea (28, 47, 64) oder aus dem Formenkreis des Lupus erythematoses (19, 28) weisen AcA auf.

Zentromerantikörper-positive Patienten mit CREST oder Akrosklerodermie zeigten weniger ausgeprägte

Immunphänomene (41), aber bereits im Initialstadium deutliche Zeichen einer vaskulären Schädigung. Demnach könnte eine früh einsetzende Langzeittherapie mit vasoaktiven und durchblutungsfördernden Medikamenten den Verlauf positiv beeinflussen.

Während CREST von einigen Autoren als eigenständige Verlaufsform betrachtet wird (49, 68), gilt es bei den meisten als gutartige Variante der PSS (55) mit Aca als wichtigsten serologischen Marker. Nach Meurer et al. (41) ist der serologische Nachweis von Zentromerantikörper geeigneter als die Abtrennung des klinisch nicht einheitlich definierten CREST-Syndroms, um bestimmte Patienten mit einer besonderen und in vielen Fällen gutartigen Verlaufsform der PSS zu charakterisieren.

Eine Gegenübertellung der Ergebnisse von Meurer et al. (41) und Chorzelski et al. (21) zeigt im untersuchten Patientenkollektiv von Meurer et al. keine Unterschiede in Bezug auf Krankheitsdauer, Lebensalter, Raynaud-Symptomatik und Ösophagusbeteiligung; die humoralen Entzündungszeichen waren bei Patienten mit Aca eher geringer ausgeprägt; in 56 % fand sich eine Akrosklerodermie, in 83 % eine subkutane Calzinose und ebenfalls in 83 % Teleangiektasien. Signifikante Unterschiede ergaben sich vor allem in Bezug auf die Haut- und Organbeteiligung. So betrug die Gelenkbeteiligung

bei CREST-Patienten mit Aca nur 35 %. Auch eine Lungenbeteiligung fand sich bei Aca-positiven CREST-Patienten nur in 22 % der Fälle, aber in 45 % aller Patienten mit CREST.

Chorzelski et al. (21) fanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aca-positiven und Aca-negativen Patienten mit Akrosklerodermie in Bezug auf die Organbeteiligung. Dagegen war die Hautbeteiligung bei Aca-positiven Patienten mit Akrosklerodermie signifikant geringer ausgeprägt als bei Patienten mit Akrosklerodermie ohne diesen Antikörper.

Erwähnenswert ist auch die Assoziation der Zentromerantikörper mit Histokompatibilitäts-Antigenen. Hier fanden Meurer et al. (41) in 44 % HLA-DR₅, in 50 % HLA-DR₁ und in 56 % HLA-A₂. Diese signifikante Assoziation deutet auf eine genetische Prägung hin, die sich im klinischen Verlauf widerspiegelt und die den Unterschied zu anderen Sklerodermieformen begründen könnte. Auch Steen et al. (54) und Black et al. (13) fanden im Gegensatz zu anderen Sklerodermiepatienten, bei Aca-positiven Patienten eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten von Aca und dem HLA-kodierten B-Lymphozyten-Antigen DR₁.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Antinukleäre Antikörper (ANA) können bei fast 90 % aller Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie (PSS) nachgewiesen werden. Besonders spezifisch für diese chronisch-entzündliche Bindegewbserkrankung sind Zentromerantikörper (AcA), die gegen einen noch nicht genau charakterisierten DNS-Proteinkomplex innerhalb der Zentromerregion von Chromosomen gerichtet sind.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Antigensubstrate zum Nachweis von AcA im indirekten Immunfluoreszenztest geeignet sind. Dazu wurden vier Zellsubstrate verwendet: Humane embryonale Fibroblasten, Fibroblasten von einer Patientin mit Sklerodermie, humane Kontrollfibroblasten und Epidermiszellen von der Maus. Im indirekten Immunfluoreszenztest reagierten alle Gewebssubstrate mit dem Referenzserum, das Zentromerantikörper enthielt und zeigten ein typisches chromosomales Bindungsmuster. Bemerkenswert ist, daß die Fibroblasten von Sklerodermiepatienten ebenso wie die Fibroblasten von gesunden Personen mit diesem Antikörper reagieren. Dieser Befund deutet darauf hin, daß Zentromerantikörper gegen normale Zellkernbestandteile und nicht gegen antigene Bestandteile gerichtet sind, die erst infolge eines krankheitsspezifischen Prozesses entstehen.

Im zweiten Teil der Arbeit wird überprüft, ob humane embryonale Fibroblasten (HE-19) anderen

Zellsubstraten als Antigensubstrat zum ANA-Nachweis überlegen sind. Diese vergleichende Untersuchung wurde in 20 Seren von Patienten mit verschiedenen Kollagenosen und unterschiedlichem ANA-Spektrum durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die heute vorwiegend verwendete HEP-2-Zelllinie, die aus menschlichem Larynxkarzinom gezüchtet wird, deutlich besser als humane Fibroblasten geeignet ist, antinukleäre Antikörper mit spezifischem Bindungsmuster zu charakterisieren.

In dem abschließenden Teil der Arbeit werden die Ergebnisse der bisher in der Literatur vorliegenden Arbeiten über Vorkommen und klinische Bedeutung von Zentromerantikörpern zusammengefaßt. Diese Übersicht zeigt, daß bis heute etwa 2.000 Patientenseren nach Zentromerantikörpern untersucht wurden, von denen 462 (23 %) diesen Antikörper aufwiesen. Bei 310 der AcA-positiven Patienten (= 67 %) wurde als Diagnose CREST oder Akrosklerodermie angegeben. Bei anderen Formen der PSS sind Zentromerantikörper dagegen nur in weniger als 10 %, bei anderen Kollagenosen nur in Einzelfällen nachweisbar gewesen. Zentromerantikörper können daher als serologischer Leitbefund für eine besondere Verlaufsform der PSS gelten, die durch eine auf die Akren begrenzte Hautsklerose und durch geringere Organbeteiligung charakterisiert ist.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alexander WRM, Brenner JM, Duthie JJR: Incidence of the antinuclear factor in human sera. Ann.Rheum.Dis. (1960) 19:338-360
2. "Arbeitsgruppe Sklerodermie" der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF): Klinik der progressiven systemischen Sklerodermie (PSS). Multizentrische Untersuchung an 194 Patienten. Hautarzt, im Druck
3. Bardawil WA, Toy BL, Galins N, Bayles TB: Disseminated lupus erythematosus, scleroderma and dermatomyositis as manifestations of sensitization to DNA-protein. Am.J.Pathol. (1958) 34:607-629
4. Barnett AJ: Scleroderma.
Charles C. Thomas, Springfield
(1974), p. 71-87
5. Barthelmes H: Das Verhalten der antinukleären Faktoren bei der Sklerodermie.
Derm.Mschr. (1975) 161:536-544
6. Beck JS: Variations in the morphological patterns of "autoimmune" nuclear fluorescence. Lancet (1961) 1:1203-1205

7. Beck JS: Autoantibodies to cell nuclei.
Scott.Med.J. (1963) 8:373-388
8. Bernstein RM, Callender ME, Neuberger JM,
Hughes GRV, Williams R: Anticentromere anti-
body in primary biliary cirrhosis.
Ann.Rheum.Dis. (1982) 41:612-614
9. Bernstein RM, Steigerwald JC, Tan EM: Associa-
tion of antinuclear and antinucleolar
antibodies in progressive systemic
sclerosis. Clin.Exp.Immunol. (1982)
48:43-51
10. Beutner EH, Nisengard RJ, Kumar V: Defined
immunofluorescence: Basic concepts
and their application to clinical
immunodermatology. In: Beutner EH,
Chorzelski TP, Bean SF (eds) Immuno-
pathology of the skin. Second edition.
John Wiley & Sons, New York-Chichester-
Brisbane-Toronto, p. 29-75
11. Beutner EH, Krassny S, Kumar V, Taylor R,
Chorzelski TP: Present levels of reproducibi-
lity and disease specificity of anti-
nuclear antibody tests. In: Beutner
EH, Nisengard RJ, Albin B (eds)
Defined immunofluorescence and rela-
ted cytochemical methods. Ann.NY.
Acad.Sci. 420:28-54

12. Beutner EH, Krassny SA, Chorzelski TP, Rodnan G, Jablonska S, Kumar V: Evaluation of methods for detection of anticentromere antibodies and other antinuclear antibodies. J.Am.Acad.Dermatol. (1985) 12:289-295
13. Black CM, Maddison PJ, Jayson MIV, Batchelor JR, Walsh KJ, Bernstein RM, Catoggio LJ, Holland CD, Hughes GRV: HLA antigens and systemic sclerosis. Arthritis Rheum. (1986) in press
14. Blaszczyk M, Beutner EH, Rogozinski T, Rzeska G, Harzabek-Chorzelska M, Jablonska S, Chorzelski TP: Substrate specificity of antinuclear antibodies in scleroderma. J.Invest. Dermatol. (1977) 68:191-193
15. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH: Dermatologie und Venerologie. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo (1984) p. 513-518
16. Breitzkreuz D, Bonkamp P, Lueder M, Fuseng NE: Morphological and biochemical criteria for keratinisation in primary and permanent mouse epidermal cell cultures. Front.Matrix.Biol. (1981) 9:57-82
17. Brenner S, Pepper D, Berns MW, Tan EM, Brinkley BR: Kinetochore structure, duplication, and distribution in mammalian cells: analysis by human autoantibodies from scleroderma patients. J.Cell.Biol. (1981) 91:95-102

18. Brentnall TJ, Kenneally DA, Barnett AJ, De Aizpurua HJ, Lolait SJ, Ashcroft R, Toh BH: Autoantibodies to fibroblasts in scleroderma. J.Clin.Lab.Immunol. (1980) 393:1-4
19. Catoggio LJ, Skinner RP, Maddison PJ: Frequency and clinical significance of anti-centromere and anti-Scl-70-antibodies in an english connective tissue disease population. Rheum.Int.Clin. Exp.Invest. (1983) 3:19-21
20. Chen ZY, Federick JA, Pandey JP, Silver R, Maricq HR, Fudenberg HH, Dobson RL, Ainsworth SK: Anticentromere antibody and immunoglobulin allotypes in scleroderma. Arch.Dermatol. (1985) 212:339-344
21. Chorzelski TP, Jablonska S, Beutner EH, Blaszczyk M, Kencka D, Krassny S, Kumar V, Tchorzewska A, Jarzabeck-Chorzelska M: Anticentromere antibody: an immunologica. marker of a subset of systemic sclerosis. Brit.J.Dermatol. (1985) 113:381-389
22. Clarke AK, Galbraith RM, Hamilton EBD, Williams R: Rheumatic disorders in primary biliary cirrhosis. Ann.Rheum.Dis. (1978) 37:42-47

23. Cox JV, Schenk EA, Olmsted JB: Human anticentromere antibodies: distribution, characterization of antigens, and effect on microtubule organization. *Cell* (1983) 35:331-339
24. Earnshaw WC, Halligan N, Cooke C, Rothfield N: The kinetochore is part of the metaphase chromosome scaffold. *J.Cell Biol.* (1984) 98:352-357
25. Emerit J: Chromosomal abnormalities in progressive systemic sclerosis. *Clin.Rheum. Dis.* (1979) 5:201-214
26. Fiessinger JN, Housset E: Sclérodermies - nosologie et classification. *Rev.Pract.* (1975) 25:1925-1931
27. French MAH, Harrison G, Penning CA, Cunningham J, Hughes P, Rowell NR: Serum immune complexes in systemic sclerosis: relationship with precipitating nuclear antibodies. *Ann.Rheum.Dis.* (1985) 44:89-92
28. Fritzler MJ, Kinsella TD, Garbutt E: The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am.J.Med.* (1980) 69:520-526
29. Fritzler MJ, Ayer LM: Anticentromere antibodies: clinical and biological significance (editorial). *J.Rheumatol.* (1982) 9:489-490

30. Fritzler MJ, Valencia DW, McCarty GA: Speckled pattern antinuclear antibodies resembling anticentromere antibodies. *Arthritis Rheum.* (1984) 27:92-96
31. Fritzler MJ, Arlette JP, Behm AR, Kinsella TG: Hereditary hemorrhagic teleangiectasia versus CREST syndrome: can serology aid diagnosis? *J.Am.Acad.Dermatol.* (1984) 10:192-196
32. Guldner HH, Lakomek JH, Bautz FA: Human anti-centromere sera recognise a 19.5 kD non-histone chromosomal protein from HeLa cells. *Clin.Exp.Immunol.* (1984) 58:13-20
33. Helmke K, Scheuermann R, Boeder T, Oppermann M, Teuber J, Federlin K: Nachweis und Bedeutung antinukleärer Antikörper in der Diagnostik der Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. *Klin.Wochenschr.* (1981) 59:287-296
34. Holubar KG, Stingl G, Albani B: Praxis und Methodologie der definierten Immunfluoreszenztechnik. *Hautarzt* (1976) 27:78-89
35. Kallenberg CGM, Pastoor GW, Wouda AA, The TH: Antinuclear antibodies in patients with Raynaud's phenomenon: clinical significance of anticentromere antibodies. *Ann.Rheumat.Dis.* (1982) 41:382-387

36. Lee EB, Anhalt GJ, Vorhees JJ, Diaz LA: Pathogenesis of scleroderma. Current concepts. Int.J.Dermatol. (1984) 23:85-89
37. Maddison P: Serologic abnormalities in systemic sclerosis. In: Black CM (ed) Proceedings of the Scleroderma Symposium, Barbican Center London (1983)
38. Makinen D, Fritzler MJ, Davis P, Sherlock S: Anticentromere antibodies in primary biliary cirrhosis. Arthritis Rheum. (1983) 26:914-917
39. McCarty GA, Rice JR, Bembe ML, Barada FA: Anticentromere antibody. Arthritis Rheum. (1983) 26:1-7
40. Meurer M, Ring J: Das Spektrum der antinukleären und antizytoplasmatischen Antikörper bei Kollagenosen. Hautarzt (1980) 31:478-485
41. Meurer M, Scharf A, Lüderschmidt Ch, Braun-Falco O: Zentromerantikörper und Antikörper gegen Scl-70-Nukleoprotein bei progressiver systemischer Sklerodermie. (Diagnostische und prognostische Bedeutung). Dtsch.med.Wschr. (1985) 110:8-14

42. Moroi Y, Peebles C, Fritzler MJ, Steigerwald J,
Tan EM: Autoantibody to centromere (kineto-
chore) in scleroderma sera.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1970) 1627-1631

43. Moroi Y, Murata I, Takeuchi A, Kamatani N,
Tanimoto K, Yokohari R: Human anticentriole
autoantibody in patients with sclero-
derma and Raynaud's phenomenon.
Clin.Immunol.Immunopathol. (1983)
29:381-390

44. Murray-Lyon IM, Thompson RPH, Ansell ID,
Williams R: Scleroderma and primary biliary
cirrhosis. Brit.Med.J. (1970)
3:258-259

45. Northway JD, Tan EM: Differentiation of anti-
nuclear antibodies giving speckled
patterns in immunofluorescence.
Clin.Immunol.Immunopathol. (1972)
1:140-154

46. Pinnaas JL, Northway JD, Tan EM: Antinuclear
antibodies in human sera. J.Immunol.
(1973) 111:996-1004

47. Powell FC, Winkelmann RK, Venencie-Lemarchand F,
Spurbeck JL, Schroeter AL: The anticentromere
antibody: disease specificity and
clinical significance. Mayo Clin.Proc.
(1984) 59:700-706

48. Ritchie RF: Antinuclear antibodies. Their frequency and diagnostic association. N.Eng.J.Med. (1970) 21:1174-1178
49. Rodnan GP, Medsger TA: Progressive systemic sclerosis - CREST syndrome: Observations on natural history and late complications in 90 patients. Arthritis Rheum. (1975) 18:423
50. Rosenthal M, Stojan B, Müller W: Differenzierung der antinukleären Antikörper zur Verbesserung ihrer diagnostischen Aussagekraft. Dtsch.med.Wschr. (1976) 101:379-384
51. Rothfield NF, Rodnan GP: Serum antinuclear antibodies in systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum. (1968) 11:607-617
52. Salerni R, Rodnan GP, Leon DF, Shaver JA: Pulmonary hypertension in the CREST syndrome variant of progressive systemic sclerosis (scleroderma). Ann.Int.Med. (1977) 86:394-399
53. Scherer R: Wertigkeit immunpathologischer Befunde für die Klinik und Prognose bei LE, SLE, PSS, DM. In: Braun-Falco O, Burg G (Hrsg) Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie. Band 10. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo (1983), 227-235

54. Steen VD, Ziegler GL, Rodnan GP, Medsger TA:
Clinical and laboratory association
of anticentromere antibodies in pa-
tients with progressive systemic
sclerosis. Arthritis Rheum. (1984)
27:125-131
55. Subcommittee for scleroderma criteria of the
American Rheumatism Association diagnostic and
therapeutic criteria committee: Preliminary
criteria for the classification of
systemic sclerosis (scleroderma).
Arthritis Rheum. (1980) 23:581-590
56. Tan EM, Rodnan GP: Profile of antinuclear anti-
bodies in progressive systemic sclero-
sis (PSS). Arthritis Rheum. (1975)
18:430
57. Tan EM, Robinson J, Robitaille P: Studies on
antibodies to histones by immunofluo-
rescence. Scan.J.Immunol. (1976)
5:811-818
58. Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ,
Peebles C: Diversity of antinuclear antibodies
in progressive systemic sclerosis.
Arthritis Rheum. (1980) 23:617-625
59. Tan EM: Antinuclear antibodies in scleroderma.
Int.J.Dermatol. (1981) 20:569-573

60. Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA).
Their immunobiology and medicine. In:
Kunkel HG, Dixon FJ (eds) *Advances
in Immunology*. Vol. 33. Academic Press
New York-London (1982), p. 167-240
61. Thibierge G, Weissenbach RJ: Concrétions cal-
carie souscutanées et scléroderme.
Ann.Dermatol.Syphiligr. (1911)
2:129-155
62. Tirri G, Migliaresi S, Picillo U, Gallo M,
Giordano M: Antinuclear antibodies (FANA) with
nucleolar pattern in progressive
systemic sclerosis. Study with two
different substrates. *Conn.Tiss.Dis.*
(1982) 1:105-114
63. Tramposch HD, Smith CD, Senegal JL, Rothfield N:
A long term longitudinal study of
anticentromere antibodies. *Arthritis
Rheum.* (1984) 27:121-124
64. Tuffanelli DL, McKeon F, Kleinsmith DM, Burn-
ham TK, Kirschner M: Anticentromere and anti-
centriole antibodies in the sclero-
derma spectrum. *Arch.Dermatol.* (1983)
560-566
65. Velayos EE, Masi AT, Stevens MB, Shulman LE:
The "CREST" syndrome. Comparison with
systemic sclerosis (scleroderma).
Arch.Intern.Med. (1979) 129:1240-1244

66. Werner D, Zimmermann HP, Rauterberg E, Spalinger J: Antibodies in the most tightly bound proteins in eukaryotic DNA. Exp.Cell Res. (1981) 133:149-157
67. Will H, Lakomek JH, Bautz EKF: Reaction of human autoantibodies with antigens of polytene chromosomes of drosophila. Exp.Cell Res. (1981) 134:129-138
68. Winterbauer RH: Multiple teleangiectasia, Raynaud's phenomenon, sclerodactylie and subcutaneous calcinosis. A syndrome mimicking hereditary hemorrhagic teleangiectasia. Bull.John Hopkins Hosp. (1964) 114:361-375

VIII. DANKSAGUNG

Herrn Prof.Dr.med.Dr.h.c. O.Braun-Falco danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeit an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Oberarzt Dr.med.M.Meurer möchte ich für die Vorbereitung und Förderung der Arbeit sowie für die freundliche Hilfe herzlichst danken.

Herrn Privatdozent Dr.med.Th.Krieg danke ich für die Unterstützung bei den Zellkulturuntersuchungen, die in der Abteilung für Bindegewebsforschung des Max-Planck-Institutes für Biochemie in 8033 Martinsried bei München durchgeführt wurden.

Ein herzliches Dankeschön auch an Frau Heilmann und Frau Ebmeyer (Dermatologische Klinik und Poliklinik) sowie an Frau Pavlovic (Max-Planck-Institut für Biochemie) für die labortechnische Beratung und Unterstützung.

Vielen Dank auch an Frau Senf für die Abfassung des Manuskriptes.

IX. LEBENSLAUF

Chérine Yousry, geb. 26.02.1960 in Kairo (Ägypten).

Vater: Dr. A. Yousry, Staatsratspräsident.

Mutter: A. E. Schmedes-Yousry, Krankenschwester
und Erzieherin.

Schulbildung und Studium:

1965 - 1971	Lycée Francais in Kairo
1971 - 1978	Deutsche Evangelische Oberschule
1975 - 1976	Englisches "General Certificate Examination"
1977	Ägyptische Reifeprüfung
1978	Deutsche Reifeprüfung (Abitur)
1978	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1981	Ärztliche Vorprüfung
1982	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1984	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1985	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

